

جداسازی و تایپینگ بروسلا ملی تنسیس از خون مبتلایان به تب مالت

رضا مقصودی*

چکیده:

بروسلوزیک بیماری عفونی مشترک بین انسان و دام «Zoonotic» است که مشکلات پزشکی و اقتصادی عظیمی را در کشور ما ایجاد کرده است. در این مطالعه از ۱۱۲۰ نفر افراد مشکوک به بروسلوز ابتدا آزمایش سروولوژی Wright test و در صورت لزوم Coomb's wright test به عمل آمد و افرادی که در تست رایت و کمپس رایت به ترتیب دارای تیتراژ آنتی بادی سرم ≥ 1 و ≥ 1 بودند مثبت تلقی گردیدند. از این افراد کشت خون و آزمایشهای هماتولوژی Hct، CBC، ESR به عمل آمد. در آزمایشهای سروولوژی تعداد ۱۱۰ نفر از نظر ابتلاء به بروسلوز مثبت بودند از کشت خون ۲۹ نفر (۲۷٪) از این افراد باکتری بروسلا جدا گردید. مؤسسه انستیتو رازی ایران همه این باکتریها را بروسلا ملی تنسیس با یوتا پیک (Biotype I) تشخیص داد. در آزمایشهای هماتولوژی لنفوسیتوز در ۸۷٪، نوتروپنی در ۷۸٪ و افزایش سرعت رسوب گلبولها در ۵۵٪ موارد دیده شد. لکوپنی و آنمی در بیماران ما مشاهده نشد.

واژه‌های کلیدی: بروسلوز، بروسلا ملی تنسیس، تایپینگ

مقدمه:

بروسلوز بیماری عفونی مهمی است که توسط گونه‌های مختلف باکتری بروسلا ایجاد می‌شود. این بیماری در انسان بروسلوز و در حیوانات سقط جنین ایجاد می‌کند (۳، ۵، ۹). جنس بروسلا حاوی ۶ گونه: بروسلا ملی تنسیس، بروسلا آبورتنوس، بروسلا سوئیس، بروسلا کانیس، بروسلا نئوتومه و بروسلا اوویس می‌باشند (۲، ۸).

بروسلا ملی تنسیس دارای سه با یوتا پیک بوده که در ارتباط با واکنش به آنتی سرمهای اختصاصی (Monospecific) M و A از یکدیگر متمایز می‌گردند. با یوتا پیک ۱ بروسلا ملی تنسیس سویه بومی ایران بوده، گرچه دو با یوتا پیک دیگر نیز کم و بیش وجود دارند. بروسلا آبورتنوس دارای نه با یوتا پیک می‌باشد (در حال حاضر با یوتا پیکهای ۷ و ۸ دیگر اعتبار ندارند).

با یوتا پیک ۳ بروسلا آبورتنوس سویه بومی ایران بوده لیکن با یوتا پیکهای دیگر نیز یافت می‌شوند. در ایران تاکنون بروسلا آبورتنوس از انسان جدا نشده است (۳، ۲). بروسلا سوئیس دارای پنج با یوتا پیک می‌باشد و معمولاً خوک را آلوده می‌کند، اما با توجه به عدم پرورش خوک در ایران در حال حاضر این گونه در ایران موجود نیست. بروسلا کانیس، بروسلا نئوتومه و بروسلا اوویس هر کدام دارای یک با یوتا پیک می‌باشند. بروسلا کانیس در ایران یافت نمی‌شود. دو گونه دیگر نیز انسان را آلوده نمی‌کنند (۲).

تشخیص بروسلوز در انسان از طریق کشت خون، کشت مغز استخوان و آزمایشهای سروولوژی امکان پذیر است (۳، ۵، ۹).

از نقطه نظر اپیدمیولوژی بروسلوز، شناخت

*عضر هیأت علمی گروه میکروبیولوژی - دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد

بایوتایپ‌های مختلف باکتری بروسلای از اهمیت خاصی برخوردار بوده که هدف اصلی این تحقیق نیز می‌باشد. این مسئله به ویژه در ارتباط با نقل و انتقال حیوانات و فرآورده‌های دامی، شناسائی سویه‌های شایع در هر منطقه ارزش زیادی دارد و نشان خواهد داد که آلودگی منطقه‌ای بوده یا از نواحی مجاور وارد شده است (۲).

مواد و روشها:

در این بررسی از تعداد ۱۱۲۰ نفر افراد مشکوک به بروسلوز که از طریق پزشکان به آزمایشگاه معرفی می‌شدند ابتدا آزمایش سرولوژی Wright test و در صورت منفی بودن یا تیترا پایین سرمی آن آزمایش Coomb's wright test به عمل آمد. افرادی که در تست رایت و کمبس رایت به ترتیب دارای تیترا آنتی‌بادی سرم $\frac{1}{16}$ و $\frac{1}{8}$ یا بیشتر بودند مثبت تلقی شدند. از این افراد در شرایط آسپتیک (Aseptic) به میزان ۱۰-۱۲ میلی لیتر خون جهت کشت خون و آزمایشهای هماتولوژی Hct, CBC, ESR اخذ شد. تستهای هماتولوژی یاد شده به روش روتین انجام و نتایج ثبت گردیدند (۱).

کشت خون با تلقیح نمونه به محیط کشت دو فازی Castaneda (ساخت شرکت Biomerux) حاوی دی اکسید کربن انجام گرفت. نمونه‌ها به مدت ۴ هفته در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد تحت انکوباسیون

(Incubation) قرار گرفتند. در این فاصله از کلنی‌های ایجاد شده بر روی فاز جامد محیط فوق نمونه‌ای را برداشته و بر روی محیط کشت جامد بروسلای آگار (Gibco laboratories and BBL) کشت مجدد انجام شد و یک نمونه در شرایط اتمسفر و دیگری در محیط حاوی ۱۰-۵ درصد دی اکسید کربن به مدت ۷۲ ساعت انکوباسیون گردیدند، همزمان قطعه‌ای از کاغذ صافی آغشته به استات سرب را جهت بررسی تولید گاز SH_2 داخل پتری دیش قرار می‌دادیم. همچنین تست اوره‌آز با تلقیح مقدار کافی از باکتری به محیط Christensen's urea agar (Difco laboratories) و آزمایشات حساسیت باکتری به رقت‌هایی از رنگهای فوشین (دورقت $\frac{1}{50000}$ و $\frac{1}{100000}$) و تیونین (سه رقت $\frac{1}{25000}$ و $\frac{1}{50000}$ و $\frac{1}{100000}$) انجام گرفت. پس از شناسائی گونه باکتری تحت عنوان بروسلای ملی -تنسیس نمونه‌ای از هر بیمار را، داخل ویال‌های در پوش دار (Universal) حاوی محیط بروسلای آگار منتقل نموده و پس از ۷۲ ساعت انکوباسیون و رشد باکتری آنها را در یخچال نگهداری کردیم. سپس با هماهنگی قبلی همه نمونه‌ها را به انستیتو رازی ایران (حصارک-کرج) جهت تایپینگ منتقل نمودیم. در آن محل حساسیت باکتریها به آنتی‌سرماهای اختصاصی (Monspecific) نوع M و A و بررسی حساسیت به Tbilisi انجام و نتایج یادداشت گردیدند.

جدول شماره ۱: مقایسه یافته‌های هماتولوژیکی در افراد مبتلا به بروسلوز با استاندارد

*درصد هماتوکریت %	*سرعت رسوب گلبولها mm/hr	درصد اتوزینوفیلها %	درصد منوسیتها %	*درصد لنفوسیتها %	*درصد نوتروفیلها %	*تعداد لکوسیتها μL	افراد مورد آزمایش
42 ± 2	19 ± 9	۲	۲	51 ± 10	47 ± 10	6600 ± 2300	بیماران بروسلوزی
۴۲	۰-۱۵	۳	۴	34 ± 4	۶۲۵	7500 ± 2000	مقادیر نرمال

* داده‌ها به صورت میانگین \pm انحراف معیار می‌باشد.

نتایج:

از تعداد ۱۱۲۰ نفر افراد مشکوک به بروسلاز ۱۱۰ نفر از نظر سربولوژی (۱۰۴ نفر با تست رایت و فقط ۶ نفر از آنها که تست رایت منفی بودند در تست کمبس رایت) مثبت شدند. در کشت خون، کلنی های کرمی رنگ، Smooth به قطر ۲-۴ میلی متر معمولاً پس از گذشت ۱۲-۵ روز در کشت های مثبت ظاهر شدند (بیماران مرحله حاد بیشترین موارد کشت مثبت را تشکیل دادند). کلنی هایی که در ۳-۱ روز اول پس از کشت ظاهر شدند مربوط به آلودگی محیط بوده (دیفترئیدها یا استافیلوکوک کوآگولاز منفی و...) و عملاً ما در کشت های بعد از ۱۶ روز هیچ نمونه مثبت (رشد باکتری بروسلا) نداشتیم. از مجموع ۱۱۰ مورد کشت خون فوق تعداد ۲۹ مورد (۲۷٪) باکتری بروسلا جدا گردید. انستیتو رازی ایران همه این باکتریها را بروسلا ملی تنسیس بایوتایپ یک تشخیص داد. در آزمایش هماتولوژی این افراد لکوسیتوز در ۸۷٪ و نوتروپنی در ۷۸٪ و افزایش سرعت رسوب گلبولها در ۵۵٪ موارد دیده شد. در بیماران مورد مطالعه آنمی مشاهده نگردید (جدول شماره ۱).

بحث:

بروسلاز بیماری عفونی مشترک بین انسان و دام است. این بیماری توسط محققین بسیاری از دیدگاههای مختلف مورد مطالعه قرار گرفته است. ذوقی و عبادی به مدت ده سال در انستیتو رازی ایران از ۵۶۸ مورد کشت خون ۱۲۱ مورد (۲۵٪) باکتری بروسلا ملی تنسیس بایوتایپ یک را جدا کردند (۱۲). در بررسی دیگری همین محققین به مدت ۱۰ سال (۱۹۷۱-۱۹۸۰) تعداد ۱۱۰۷ مورد باکتری بروسلا را تایپینگ نمودند که اکثر آنها بایوتایپ یک بودند در این بررسی مشخص شد که عامل بروسلاز در استانهای اصفهان، خراسان، گیلان، خوزستان، یزد و آذربایجان شرقی اختصاصاً بایوتایپ

یک بوده است (۱۳). در مطالعه ما نیز همه باکتریهای جدا شده از کشت خون بایوتایپ یک بودند.

Gotuzzo و همکاران از ۵۰ بیمار بروسلازی پس از دو بار کشت خون توانستند ۷۰٪ باکتری بروسلا را جدا نمایند (۸). همچنین Gaffar در مطالعه ای در سودان بر روی ۲۹ بیمار توانسته است ۷۵/۹٪ باکتری بروسلا ملی تنسیس را جدا نماید (۶) که این نتایج با یافته های این بررسی مطابقت دارد.

Sharda و همکاران از کشت خون مکرر مبتلایان به بروسلاز توانسته اند ۴۲٪ باکتری بروسلا ملی تنسیس را جدا کنند که در ۹۲/۹٪ این بیماران لنفوسیتوز دیده شده است (۱۱).

Crosby و همکاران تغییرات هماتولوژی را در ۳۸ بیمار بررسی کرده اند و لنفوسیتوز را در ۶۳٪، لکوپنی در ۴۵٪، نوتروپنی در ۲۱٪ و آنمی را در ۷۴٪ و افزایش سرعت رسوب گلبولها را در اکثر بیماران خود دیده اند (۴). Malik و همکاران نیز در عربستان سعودی آنمی خفیف لنفوسیتوز و لکوپنی را در بیماران مبتلا به بروسلاز گزارش نموده اند (۱۰).

Galankis و همکاران از ۴۲ بیمار مبتلا به بروسلا آزمایشهای هماتولوژی به عمل آورده و در آنها ائوزینوفیلی، لنفوپنی و منوسیتوز مشاهده نموده اند (۷). یافته های هماتولوژی ما در مورد لنفوسیتوز و نوتروپنی و افزایش ESR با اکثر محققین فوق هماهنگی دارد در صورتی که با لکوپنی و آنمی که توسط برخی از آنها گزارش شده هماهنگی ندارد. یافته های ما همچنین با نتایج Galankis که ائوزینوفیلی و لنفوپنی و منوسیتوز را در بیماران خود گزارش نموده اند مطابقت ندارد.

پیشنهادهات:

پیشنهاد می گردد به دلیل مخاطراتی که کشت باکتری بروسلا به همراه دارد در هنگام کار با این باکتری نهایت

تشکر و قدردانی:

بدینوسیله از همکاری انسان والا، آقای دکتر اسماعیل ذوقی و همکاران در بخش بروسلوز انستیتو رازی ایران به خاطر همکاری در تایپینگ باکتری‌ها تشکر می‌نمایم.

دقت به عمل آید و استفاده از هود (Safety cabinet) شیشه‌ای مناسب دارای اهمیت می‌باشد نگارنده علی‌رغم احتیاط‌های زیاد (استفاده از عینک، ماسک و دستکش یکبار مصرف) پس از جدا کردن سومین نمونه باکتری، مبتلا به بروسلوز گردیده است.

منابع:

- ۱- بارون باربارا. اصول همانولوژی و روشهای آزمایشگاهی. ترجمه آرم طالب.؛ نادعلی فاطمه. اصفهان: دانشگاه علوم پزشکی اصفهان - معاونت پژوهشی، چاپ اول، ۱۳۷۷-۲۴۷، ۱۳۷۰.
- ۲- ذوقی اسماعیل. تعیین تیپ بروسلاها در ایران. خلاصه مقالات اولین کنگره بروسلا و بروسلوزیس در انسان و حیوانات، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، دومین مقاله: ۸-۳، ۱۳۷۱.
- ۳- سازمان بهداشت جهانی. تشخیص-درمان و پیشگیری بروسلوز. ترجمه ذوقی اسماعیل. تهران: انتشارات دانش پژوه (تجدید نظر دوم)، ۱۳۶۵، ۱۳-۲۷.
- 4- Crosby E.; Liosa L.; Miroqulsada M.; Carrillo C.; et al. Haematologic changes in brucellosis. J Infect Dis, 150(3): 419-24, 1984.
- 5- Fingold MS.; Martin WJ. Microorganisms encountered in the blood. In: Fingold MS.; Martin WJ. Diagnostic microbiology: From Mosby Company. California: USA, 8th ed. 197-223, 1990.
- 6- Gaffarmohd M. Brucellosis in the Gezira area central sudan. J Trop Med Hyg, 92(2): 86-8, 1989.
- 7- Galanakis E.; Bourantas KL.; Levediotou S.; Lapatsanis PD. Childhood brucellosis in north- western Greece: a retrospectiv analysis. Eur J Pediatr, 155(1): 1-6, 1996.
- 8- Gotuzzo E.; Carrillo C.; Guerra J.; Liosa L. An evaluation of diagnostic methods for brucellosis: the value of bone marrow culture. J Infect Dis, 153(1): 122-5, 1986.
- 9- Jawetz E.; Melnick L.; Adelberg EA. Haemophilus, Brucella & brucella. In: Jawetz E.; Melnick JL., Adelberg EA. Review of medical microbiology: From Appleton & Lange. New-Jersey: USA, 20th ed. 231-7, 1995.
- 10- Malik GM. A clinical study of brucellosis in adults in the Asir region of southern saudi Arabi. Am J Trop Med Hyg, 56(4): 375-7, 1997.
- 11- Sharada DC.; Lubani M. A study of brucellosis in childhood. Clin Pediatr Phila, 25(10): 492-5, 1986.
- 12- Zowghi E.; Ebadi A. A survey on human brucellosis (malta fever) in Iran. Arch Inst Razi, (36): 69-74, 1986.
- 13- Zowghi E.; Ebadi A. Typing of brucella strains in Iran. Arch Inst Razi, 33: 109-14, 1982.